复发性自然流产模型小鼠与正常妊娠小鼠着床期尿蛋白质组的比较

王海彤[1]，高友鹤[1]*

[1]（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要

目的：初步探索妊娠着床失败是否能通过尿液蛋白质组变化进行反映。

方法：收集复发性自然流产（Recurrent spontaneous abortion ,RSA）模型小鼠着床期（E3.5和E4.5）流产时的尿液样品和正常妊娠小鼠着床期（E3.5和E4.5）尿液样品，通过高效液相色谱串联质谱联用（LC-MS/MS）的非标记定量蛋白质组学技术进行分析，筛选尿液蛋白质组的差异蛋白（FC＞1.5 或＜0.67，P<0.050）进行蛋白质功能和生物学通路分析。

结果：RSA模型小鼠共4只，均未产仔；正常妊娠小鼠共3只，正常妊娠，于E21时分别产仔7、8、9只。E3.5时可以鉴定到23个差异蛋白，E4.5时可以鉴定到21个差异蛋白。通过Uniprot数据库和Pubmed数据库检索差异蛋白和相关文献报道，近一半的差异蛋白与着床相关。差异蛋白通过David数据库富集到大量与着床过程相关的生物学通路。

结论：相当于在妊娠女性的血人绒毛促性腺激素水平还未出现变化，现有手段无法进行观测和准确判断是否怀孕时，RSA模型小鼠相较于正常妊娠小鼠，在着床期时尿液蛋白质组就发生了变化，部分变化蛋白的已知功能与着床相关。

关键词：尿液蛋白质组　复发性自然流产小鼠模型　着床

Comparison of urinary proteome between recurrent spontaneous abortion model mice and normal pregnant mice during implantation

Haitong Wang[1] Youhe Gao[1]*

[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract

Objective: To explore whether pregnancy implantation failure can be reflected by urine proteome changes.

Methods: The urine samples of Recurrent spontaneous abortion (RSA) model mice during implantation (E3.5 and E4.5) and normal pregnant mice during implantation (E3.5 and E4.5) were collected. The protein function and biological pathways were analyzed by non-label quantitative proteomics using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Differential proteins (FC > 1.5 or < 0.67, P<0.050) in the urine proteome were screened.

Results: There were 4 mice in RSA model, none of which gave birth. There were 3 normal pregnant mice, and 7, 8 and 9 litters were born respectively at E21. At E3.5, 23 differential proteins could be identified, and at E4.5, 21 differential proteins could be identified. According to

---

基金项目：北京师范大学（11100704）

作者简介：1.王海彤.（2000.4—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物。

通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

Uniprot database and Pubmed database search and related literature reports, nearly half of the differential proteins were associated with implantation. The differential proteins were enriched into a large number of biological pathways related to the implantation process through the David database.
Conclusions: In other words, when the level of human villus gonadotropin in the blood of pregnant women has not changed, and it is impossible to observe and accurately judge pregnancy by existing means, compared with normal pregnant mice, the urine proteome of RSA model mice has changed during the implantation stage, and the known functions of some of the changed proteins are related to implantation.
Keywords: urine proteome; recurrent spontaneous abortion mouse model; implantation

1 引言

着床是指妊娠过程中囊胚附着、侵入并深埋在母体子宫内膜，与母体血管建立联系以实现物质交换的过程。成功着床后囊胚才能通过摄取母体血液中的营养继续发育，否则将导致妊娠中止。在着床过程中，胚胎发育到囊泡阶段进入子宫准备着床，同时子宫内膜也需要分化到囊胚接受状态，通过免疫细胞、细胞因子、生长因子、趋化因子和粘附分子等进一步支持着床，囊胚才能成功着床[1 2 3 4 5]。在人类中，着床效率非常低，成功率不超过30%[6]，且现有手段无法对着床期进行监测，更无法有效地判断着床是否成功以及提供促进着床的干预。

尿液是血液经肾脏过滤所产生，用以排除代谢废物，不受内环境稳态调节机制的控制，能更敏感地保留机体产生的各种微小变化[7]。目前已有大量这证明这观点，如：糖尿病小鼠模型中，尿糖紊乱早于血糖变化[8]、阿尔兹海默症的转基因小鼠的尿蛋白质组在脑部淀粉斑块沉积出现之前，就有 29 个蛋白发生变化，而其中有 24 个蛋白被报道过与阿尔兹海默症相关或作为标志物[9]。更有研究表明，尿蛋白组能反映大鼠正常妊娠过程中胚胎的发育 10。本研究尝试通过建立小鼠复发性自然流产（Recurrent spontaneous abortion ,RSA）模型，收集着床期间尿液样本进行蛋白质组学分析，与正常妊娠小鼠着床期间尿液蛋白质组进行对比，以探索着床过程是否能通过尿液进行反应。

BALB/c、CBA/J 和 DBA/2 是三种常见的小鼠近交品系，对饲养条件要求不高，繁殖力强，繁育成本低，国内实验动物来源稳定且充足。其中 CBA / J 雌鼠与 DBA / 2 雄鼠交配，雌鼠反复自然流产，且流产率相对恒定，是常用的 RSA 模型，而 CBA / J 雌鼠与 BALB / c 雄鼠交配，雌鼠能够正常妊娠[10]，可作为正常妊娠小鼠与 RSA 模型小鼠对照。小鼠 RSA 模型的流产属于染色体正常胚胎的反复吸收，流产发生于胚胎着床期，即妊娠第 3.5 天（E3.5）至妊娠第 4.5 天（E4.5），目前认为免疫因素是导致这一模型反复自然性流产的主要原因[11 12 13]。

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物

14 周龄 CBA/J 雌性小鼠 7 只，14 周龄 DBA/2 雄性小鼠 4 只，BALB/c 雄性小鼠 3 只，购于北京华阜康生物科技股份有限公司。所有小鼠在标准环境中饲养（室温（22±1）°C，湿度 65%-70%）。将所有大鼠在新环境中饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准，批准编号为 CLS-AWEC-B-2022-003。

2.2 实验方法

2.2.1 自然流产小鼠建模

CBA/J 雌鼠分为两组，RSA 组 4 只，Control 组 3 只。RSA 组雌鼠与 DBA/2 雄鼠以 1：1 比例于 16：00 合笼，次日 7：00 对雌鼠进行检栓，检出阴栓者视为 RSA 模型建模成功，记为妊娠第 0.5 天（E0.5）。Control 组雌鼠与 BALB/c 雄鼠以 1：1 比例于 16：00 合笼，次日 7：00 对雌鼠进行检栓，检出阴栓者记为妊娠第 0.5 天（E0.5）。

2.2.2 尿液样本收集

雌鼠单独饲养。交配前，收取每只雌鼠尿液样本记为 D0，暂存于-80℃冰箱。交配后，在小鼠妊娠着床期即妊娠第 3.5 天（E3.5）和妊娠第 4.5 天（E4.5），收取尿液样本，暂存于-80℃冰箱。

2.2.3 尿液样本处理

尿蛋白提取：-80℃冰箱中取出小鼠尿液样本， 4°C 的条件下解冻。4℃，12000×g 离心 30 min，取 500 μL 上清液于 2 mL 离心管中，加入三倍体积的预冷无水乙醇，上下颠倒轻柔混匀，-20°C 沉淀过夜蛋白。过夜沉淀的混合液 4°C，12000×g 离心 30 min，弃上清，等待乙醇挥发干燥。将蛋白沉淀重悬于裂解液中(含 8 mol/L 尿素，2 mol/L 硫脲，25 mmol/L 二硫苏糖醇，50 mmol/L Tris)。 4°C， 12000×g 离心 30 min，取上清于新的 1.5 mL 离心管内，获得尿液蛋白质。用 Bradford 法测定蛋白质浓度。

尿蛋白酶切：取 100 µg 尿液蛋白质样品于 1.5 mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液使总体积为 200 µL。加入 20 mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀，金属浴 97°C 加热 10 min，冷却至室温。加入 50 mM 碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），涡旋混匀，室温避光反应 40 min。 取 10 kDa 超滤管(Pall, Port Washington, NY, USA) 向滤膜上加入 200 µL UA 溶液 (8 mol/L 尿素，0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.5)洗涤滤膜，18°C，14000×g 离心 5 min，弃去下层滤液，重复一次；向滤膜上加入碘乙酰胺处理完成后的尿液蛋白质样品，18℃，14000×g 离心 30 min，弃去下层滤液，尿液蛋白质留在滤膜上；向滤膜中加入 200 µL UA 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；向滤膜中加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液洗涤尿液蛋白质，18°C，14000×g 离心 30 min，重复两次；按胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行酶切，37°C 水浴 15 h。酶切结束后 4℃，13000×g 离心 30 min 收集滤液，该滤液为多肽混合液。将多肽混合液通过 HLB 固相萃取柱(Waters，Milford，MA)进行除盐，使用真空干燥仪冻干，于-20°C 条件下保存。

2.2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

0.1%甲酸溶解多肽混合液冻干，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5 µg/µL。每个样品取 6 µL 混匀，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集 10 份流出液（Fractions），使用真空干燥仪冻干后用 0.1%甲酸复溶。以对 10 份流出液和全部单个样品以样品 : iRT 体积比为 10 : 1 的例加入 iRT 试剂(Biognosys, Switzerland)，以校准提取的肽峰的保留时间。

10 份流出液使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 Data Dependent Acquisition(DDA)模式进行质谱分析并采集数据，生成 10 份 raw 文件，导入 Proteome Discoverer 软件采用 Swiss-iRT 和 Uniprot-mouse 数据库进行建库分析（version 2.0, Thermo Scientific）。根据建库结果设定单个样品 Data Independent Acquisition(DIA)模式

的 39 个可变窗口建立 DIA 方法。单个样品取 1 μg 肽段，使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)进行分离，分离的肽段经过 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)以 DIA 模式进行质谱分析，采用新建立的 DIA 方法进行 DIA 采集数据，生成 raw 文件。

2.2.5 Label-free DIA 定量分析

将 DIA 模式下采集的单个样品 raw 文件导入 Spectronaut Pulsar(Biognosys AG, Switzerland)软件进行分析。由 MS2 中各片段离子的峰面积相加，计算肽段丰度。由各自的肽段丰度相加计算蛋白质丰度。

2.2.6 数据分析

每个样本进行 3 次技术重复，取平均值进行统计学分析。本实验进行组间对比，将 RSA 组和 Control 组进行比较，筛选差异蛋白。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（FC, Fold change）≥1.5 或≤0. 67，双尾非配对 t 检验分析的 P 值＜0.05。筛选到的差异蛋白通过 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行分析，并在 Pubmed 数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov）中检索相关文献，对差异蛋白进行功能分析。

3 实验结果与分析

3.1 自然流产小鼠建模情况

小鼠 RSA 模型建立后，在雌鼠妊娠期进行行为学观察， RSA 组饮水量正常，Control 组饮水量明显上升；E13.5 时，RSA 组体型无明显变化，Control 组体型明显增加。RSA 组 4 只雌鼠均未产仔，建模成功；Control 组 3 只雌鼠正常妊娠，于 E21 时分别产仔 7、8、9 只。

3.2 小鼠自然流产模型尿液蛋白质组变化分析

3.2.1 差异蛋白功能分析

将 E3.5 时 RSA 组与 Control 组尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 t 检验 $P<0.05$。结果表明 E3.5 时，RSA 组与 Control 组相比，可以鉴定到 23 个差异蛋白，将差异蛋白通过 Uniprot 进行检索，结果如表 1 所示。

将鉴定到的 23 个差异蛋白经过 PubMed 数据库进行文献检索，其中 9 个蛋白被报道与着床直接相关。Urokinase-type plasminogen activator 在小鼠和人着床期的滋养层细胞中表达，参与着床过程中子宫内膜的侵袭和组织重塑 [14 15 16]。Carbonic anhydrase 在小鼠囊胚着床过程中充当调节因子 [17]。Cathepsin 参与小鼠着床过程中子宫的蜕膜化，是囊胚着床必需的 [18]。Transforming growth factor beta receptor type 3 作为 Transforming growth factor β (TGF-β) superfamily members 辅助受体，参与小鼠和人着床过程中 TGF-β 及其下游信号通路介导的滋养层细胞侵袭子宫内膜和子宫蜕膜化 [19 20 21]。Sphingomyelin phosphodiesterase 参与鞘脂代谢，在小鼠着床期子宫的鞘脂代谢改变，Sphingomyelin phosphodiesterase 表达升高，聚集在母体-胚胎接触面上 [22]，鞘脂代谢调节子宫蜕膜化和血管稳定性，鞘脂代谢紊乱也是人类流产的原因之一 [23]。Furin 调节 E-钙粘蛋白加工介导的小鼠囊胚细胞间粘附和非极性内细胞团分化 [24 25]。Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 活性受到影响，曾被报道导致小鼠因着床失败而流产 [26]。Collagen alpha-1(IV) chain 在小鼠胚胎着床前子宫内膜和子宫肌层中高表达，着床后表达降低 [27]，人类女性子宫内膜 Collagen alpha-1(IV) chain 下调，降低内膜上皮的黏附能力，进而导致着

床失败和不孕[28]。

其余差异蛋白大多为酶，参与蛋白质、糖蛋白、核酸和脂代谢；介导细胞信号转导、细胞增殖、细胞运动和黏附，虽尚未有研究报道，但其功能也有可能参与小鼠囊胚入侵子宫内膜的着床过程，如：N-acetylglucosamine-6-sulfatase 介导硫酸乙酰肝素和硫酸角质素的水解，小鼠囊胚滋养层细胞表达硫酸乙酰肝素蛋白多糖，子宫上皮细胞表达几种互补的硫酸乙酰肝素结合蛋白，支持囊胚着床过程中附着在子宫内膜[29]。Prostaglandin F2 receptor negative regulator 通过减少受体数量抑制前列腺素 F2α 与其受体的结合，限制其发挥功能，而前列腺素在小鼠囊胚着床期间的子宫内膜蜕膜化中发挥重要作用[30]。尤其是 Solute carrier family 12 member 3 在 Control 组小鼠尿液蛋白质组中未出现，而在 RSA 组每只的小鼠尿液蛋白质组中均出现，该蛋白与免疫因素相关，是白介素 18 的受体，有助于白介素 18 诱导细胞因子干扰素 γ（IFNG）、白介素 6、白介素 18 和催化因子配体 2（CCL2）产生。IFNG 在小鼠的正常妊娠中起着关键作用，启动子宫内膜脉管系统重塑，着床部位的血管生成以及胎盘蜕膜成分的维持[31]；白介素 18 控制人类胚胎着床过程，白介素 18 过度激活或缺失均会导致着床失败[32]；白介素 6 的缺失会导致小鼠子宫可着床位点减少[33]；CCL2 被认为具有预测人类复发性流产和复发性着床失败的价值[34]。这可能表明，Solute carrier family 12 member 3 具有作为尿液蛋白质标志物预测流产的能力。

表 1 E3.5 时小鼠 RSA 模型差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value	Related to implantation
1P59158	Solute carrier family 12 member 3	从无到有	↑	1.59E-02	
O54965	E3 ubiquitin-protein ligase RNF13	4.47	↑	4.94E-02	
Q8BFR4	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	2.75	↑	2.69E-02	
P54763	Ephrin type-B receptor 2	0.48	↓	4.91E-02	
C0HKG5	Ribonuclease T2-A*	0.41	↓	4.78E-02	
C0HKG6	Ribonuclease T2-B *	0.41	↓	4.78E-02	
P06869	Urokinase-type plasminogen activator	0.40	↓	3.44E-02	14 15 16
P00920	Carbonic anhydrase 2	0.39	↓	1.98E-02	17
Q8BM88	Cathepsin O	0.38	↓	4.75E-02	18
O88393	Transforming growth factor beta receptor type 3	0.32	↓	3.84E-02	19 20 21
Q99LJ1	Tissue alpha-L-fucosidase	0.30	↓	3.98E-02	
O89051	Integral membrane protein 2B	0.30	↓	4.42E-02	
Q99N23	Carbonic anhydrase 15	0.27	↓	4.57E-02	17
Q05909	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	0.24	↓	1.30E-02	
Q04519	Sphingomyelin phosphodiesterase	0.24	↓	2.31E-02	22 23
O35448	Lysosomal thioesterase PPT2	0.24	↓	3.47E-02	
Q9WV91	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	0.23	↓	6.41E-03	
P23188	Furin	0.22	↓	6.16E-03	24 25
Q8QZR4	Out at first protein homolog	0.20	↓	2.33E-02	
P36369	Kallikrein 1-related peptidase b26	0.18	↓	3.68E-02	
P24369	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0.16	↓	3.28E-02	26

Q8VBT3	Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor	0.15	↓	6.75E-03	
P02463	Collagen alpha-1(IV) chain	0.11	↓	2.25E-03	27 28

*Ribonuclease T2-A、Ribonuclease T2-B 氨基酸序列完全相同，具有 100%的相似性（数据来自 Uniprot）。

将 E4.5 时 RSA 组与 Control 组尿液蛋白质进行比较，筛选差异蛋白条件为：FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 t 检验 $P<0.05$。结果表明 E4.5 时，RSA 组与 Control 组相比，可以鉴定到 21 个差异蛋白，将差异蛋白通过 Uniprot 进行检索，结果如表 2 所示。

将鉴定到的 21 个差异蛋白经过 PubMed 数据库进行文献检索，其中 11 个蛋白被报道与着床直接相关。Eosinophil chemotactic cytokine 在人类子宫内膜和胎盘中表达，其受体在滋养层细胞上表达，Eosinophil chemotactic cytokine 增加了滋养层迁移和侵袭、对纤连蛋白和胶原蛋白粘附的能力 [35]。Desmoglein-1 是细胞间桥粒连接的组成部分，参与斑块蛋白和中间丝相互作用介导的细胞间粘附，在人类和大鼠着床期间，子宫上皮细胞质膜上 Desmoglein-1 重新分布为囊胚着床做准备，有助于滋养层细胞入侵子宫内膜 [36 37]。Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog 是上皮细胞顶端连接复合体的组分，参与同源细胞的黏附和白细胞的跨上皮迁移，在小鼠着床期的囊胚滋养层细胞和子宫内膜上皮细胞中表达，参与到着床过程中囊胚和子宫内膜的相互作用 [38]。OX-2 membrane glycoprotein 参与异型细胞间黏附，小鼠 E4.5 时滋养层和蜕膜细胞表达该蛋白能抑制自然杀伤细胞活性，防止流产 [39]，RSA 模型中小鼠的流产也可以被该蛋白所缓解 [40]。Endoglin 是在血管生成中起重要作用的血管内皮糖蛋白 [41]，调节血管内皮细胞的迁移，是正常胚胎外血管生成和胚胎心脏发育所需 [42 43]。Endoglin 是一种 TGF-β 受体，在滋养层细胞和子宫内膜细胞中表达，维持人和小鼠子宫内膜容受性，调节滋养层细胞增殖和侵袭，对于胚胎着床十分重要 [44 45]，Endoglin 还参与滋养层细胞侵入子宫螺旋动脉重塑子宫血管和胎儿胎盘脉管系统，以维持血管稳态 [46]。Corticosteroid-binding globulin 是几乎所有脊椎动物血液中糖皮质激素和孕激素的主要转运蛋白，是人类反复着床失败患者子宫内膜的特异性蛋白 [47]，该蛋白在仓鼠着床期的合成和分泌增加 [48]，小鼠着床过程中子宫内膜的蜕膜化也需要黄体不断产生的孕激素维持蜕 [49]。Kallikrein 1 在大鼠和人类子宫中表达，在囊胚着床子宫内膜中发挥作用 [50 51]，可能是通过舒张血管，抗血小板聚集，促进细胞增殖和滋养层侵袭参与胎盘血流的建立和维持 [52]。TGF-beta receptor type-1 参与囊胚发育和子宫内胚胎发育，对于人类囊胚着床和维持子宫蜕膜化至关重要 [53]，敲除小鼠 TGF-beta receptor type-1 基因会导致小鼠着床缺陷，滋养层细胞紊乱，子宫自然杀伤（uNK）细胞减少以及螺旋动脉重塑受损 [54]。Transcobalamin-2 结合维生素 B12 向细胞转运，有报道 Transcobalamin-2 在韩国女性复发性着床失败中具有潜在作用 [55]。

其余差异蛋白虽尚未有研究报道，但其功能也有可能参与小鼠囊胚入侵子宫内膜的着床过程，如：Adipocyte enhancer-binding protein 1 正调控胶原纤维形成，可能参与细胞外基质的组织与重塑。Leukocyte surface antigen CD47 是介导细胞间相互作用的黏附蛋白，参与细胞黏附和增殖、血管生成的过程，同时介导细胞对白介素 1 的反应、白介素 6 的生成，二者均在囊胚着床过程发挥作用 [20]。Galectin-3-binding protein 促进整合素介导的细胞粘附，可能参与抑制肿瘤细胞入侵。Neprilysin 参与胎盘发育，有研究认为 Neprilysin 可通过调节子宫内膜白介素 1 和内皮素 1 代谢参与囊胚着床过程，维持子宫内膜处于着床的最佳状态 [56]。Leucine-rich repeat-containing protein 19 是病原识别受体，介导 TRAF2 NF-kappa-B 信号通路的激活，诱导促炎细胞因子的表达 [57]，已有研究表明 TRAF2 / NF-κB 轴调节线粒体动力学和细胞凋亡，导致女性绒毛膜绒毛功能障碍，是在复发性流产的关键原因 [58]。

表 2 E4.5 时小鼠 RSA 模型差异蛋白

Uniprot ID	Protein names	Fold change	Trend	P value	Related to implantation
O35744	Eosinophil chemotactic cytokine	从无到有	↑	3.09E-02	35
Q640N1	Adipocyte enhancer-binding protein 1	20.18	↑	3.84E-02	
Q61495	Desmoglein-1-alpha*	13.78	↑	1.36E-02	36 37
Q7TSF1	Desmoglein-1-beta*	13.78	↑	1.36E-02	36 37
P97792	Coxsackievirus and adenovirus receptor homolog	12.85	↑	4.34E-02	38
O54901	OX-2 membrane glycoprotein	11.11	↑	2.54E-02	39 40
Q9JHY3	WAP four-disulfide core domain protein 12	10.36	↑	3.19E-02	
Q61735	Leukocyte surface antigen CD47	9.08	↑	4.52E-02	
Q9CQW3	Vitamin K-dependent protein Z	8.09	↑	3.01E-02	
Q8K135	Dyslexia-associated protein KIAA0319-like protein	7.92	↑	3.15E-02	
Q63961	Endoglin	7.34	↑	1.29E-02	44 45 46
Q06770	Corticosteroid-binding globulin	6.83	↑	8.48E-03	47 48
P15945	Kallikrein 1-related peptidase b5	6.77	↑	3.19E-02	50 51 52
P32507	Nectin-2	6.66	↑	1.40E-02	
Q64729	TGF-beta receptor type-1	6.62	↑	3.29E-02	53 54
Q07797	Galectin-3-binding protein	6.26	↑	3.56E-02	
O88968	Transcobalamin-2	5.15	↑	3.07E-02	55
Q61391	Neprilysin	4.90	↑	3.57E-02	56
P10404	MLV-related proviral Env polyprotein	4.88	↑	4.06E-02	
Q8BZT5	Leucine-rich repeat-containing protein 19	4.66	↑	4.49E-02	57 58
Q9Z1R3	Apolipoprotein M	4.58	↑	4.63E-02	

*Desmoglein-1-alpha 与 Desmoglein-1-beta 具有 90%的相似性（数据来自 Uniprot）。

3.2.2 差异蛋白生物学通路分析

利用 David 数据库分别对 E3.5 和 E4.5 时的差异蛋白进行生物学通路的分析。

有 10 个生物学过程被 E3.5 时的差异蛋白富集到，结果如表 3 所示。这些生物学通路主要涉及细胞迁移；蛋白质、核酸、碳水化合物的代谢；血管生成，这很可能与着床过程中囊胚滋养层入侵子宫蜕膜，建立与母体血液的联系相关。尤其是 Transforming growth factor beta receptor signaling pathway 更是在小鼠和人类囊胚着床和胎盘形成过程中重要作用 [20]。

表 3 E3.5 时小鼠 RSA 模型差异蛋白富集的生物学过程

Pathways	P value
positive regulation of viral entry into host cell	3.09E-02
negative regulation of epithelial cell migration	3.84E-02
proteolysis	3.84E-02
RNA catabolic process	1.36E-02

positive regulation of bone resorption	1.36E-02
positive regulation of cell migration	4.34E-02
positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	2.54E-02
angiogenesis	3.19E-02
one-carbon metabolic process	4.52E-02
zymogen activation	3.01E-02

有 16 个生物学过程被 E4.5 时的差异蛋白富集到，结果如表 4 所示。这些生物学通路主要涉及细胞黏附和运动；蛋白质水解与加工；血管生成，这很可能与着床过程中囊胚滋养层入侵子宫蜕膜，建立与母体血液的联系相关。有研究表明，上皮-间充质细胞转化参与到女性着床过程，子宫官腔上皮细胞以及蜕膜化基质细胞获得间充质细胞的运动和迁移能力，以适应囊胚滋养层细胞的入侵 [59]。SMAD 作为 Transforming growth factor beta 超家族下游信号分子，也参与到小鼠和人类囊胚着床、胎盘形成过程 [20]。

表 4 E4.5 时小鼠 RSA 模型差异蛋白富集的生物学过程

Pathways	P value
cell adhesion	2.00E-05
peptide metabolic process	1.10E-04
cell-cell adhesion	1.10E-03
protein processing	4.00E-03
positive regulation of epithelial to mesenchymal transition involved in endocardial cushion formation	4.90E-03
germ cell migration	1.10E-02
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	1.20E-02
ventricular trabecula myocardium morphogenesis	1.70E-02
proteolysis	2.10E-02
acrosome assembly	2.70E-02
artery morphogenesis	2.80E-02
angiogenesis	3.40E-02
heart development	3.60E-02
cell motility	3.80E-02
epithelial to mesenchymal transition	4.50E-02
positive regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation	4.80E-02

4 展望

复发性自然流产（Recurrent spontaneous abortion ,RSA）定义为与同一性伴侣在妊娠 28 周内连续 3 次及以上流产。目前也有认为，连续 2 次流产与连续 3 次流产的患者具有复发性流产的风险相似 [60]。大约 2-5%的育龄妇女受到 RSA 的影响，对女性造成巨大的心理和精神创伤，也造成了经济负担。女性年龄、解剖和染色体异常、遗传、内分泌、胎盘异常、感染、免疫、吸烟和饮酒、心理因素、暴露于重金属、辐射等污染环境等多种因素均可导致 RAS[60 61 62]。除此以外，大约 50 % RSA 患者患病的原因尚不明确，这些原因不明的流产往往与免疫因素相关 [63]。RAS 病因如此复杂，患者往往缺乏特异的临床表现，这也使

得 RSA 难以诊断和预测。即使存在异常的检查结果，大多数患者也无法进行循证治疗，经验性和联合多重治疗仍然是主要方法 [60]。确定 RSA 的高选择性生物标志物，为 RSA 患者提供及时灵敏的孕期监控预测、探索新的诊断方式，辅助精准的治疗，是如今亟待解决的问题。 尿液蛋白质组能反应 RAS 小鼠与正常妊娠小鼠着床期的变化。提示尿液蛋白质组具有监测妊娠着床期发展的能力，具有理解着床失败机制的潜能，为寻找潜在的干预靶点打下基础。

参考文献

1 Kämmerer U, von Wolff M, Markert UR. Immunology of human endometrium. Immunobiology. 2004, 209(7):569-74.

2 Giudice LC. Implantation and endometrial function. In: BCJM Fauser (ed) Molecular biology in reproductive medicine. Parthenon Publishing Group, New York, NY, USA, London, UK. 1999.

3 Dimitriadis E, White CA, Jones R, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. Hum Reprod Update. 2005, 11:613–630.

4 Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. Annals of the New York Academy of Sciences. 1986, 476, 36–42.

5 Dominguez F, Pellicer A, Simon C. Paracrine dialogue in implantation. Mol Cell Endocrinol. 2002, 186:175–181

6 Miller JF, Williamson E, Glue J et al. Fetal loss after implantation. A prospective study. Lancet. 1980, 2, 554–556.

7 高友鹤. 尿液有可能成为生物标志物的金矿吗? 中国科学 生命科学, 2013, 43(8): 708-708

8 Wei Yin, Weiwei Qin, Youhe Gao Urine glucose levels are disordered before blood glucose level increase was observed in Zucker diabetic fatty rats. Sci China Life Sci. 2018, 61:844-8

9 Zhang F, Wei J, Li X, Ma C, Gao Y. Early Candidate Urine Biomarkers for Detecting Alzheimer's Disease Before Amyloid-β Plaque Deposition in an APP (swe)/PSEN1dE9 Transgenic Mouse Model. J Alzheimers Dis. 2018, 66(2):613-637.

10 Ansariniya H, Zare F, Mosaffa N, Idali F, Shabani M, Hadinedoushan H. Immunologic deviations in recurrent spontaneous abortion mouse model. Am J Reprod Immunol. 2022, 88(6):e13631.

11 林羿.以小鼠 CBA/J×DBA/2 模型为基础的妊娠耐受机理研究.暨南大学. 2002.

12 Takaoka K , Hamada H .Cell fate decisions and axis determination in the early mouse embryo. Development. 2011.

13 安德拉斯・纳吉. 小鼠胚胎操作实验手册(原著第三版). 化学工业出版社. 2006.

14 Whiteside EJ, Kan M, Jackson MM, Thompson JG, McNaughton C, Herington AC, Harvey MB. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and activity during early embryo development in the cow. Anat Embryol (Berl). 2001, 204(6):477-83.

15 Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Castillo-Trápala A, Armant DR. Regulation of proteinases during mouse peri-implantation development: urokinase-type plasminogen activator expression and cross talk with matrix metalloproteinase 9. Reproduction. 2010, 201, 141(2):227-39.

16 Monzón-Bordonaba F, Wang CL, Feinberg RF. Fibronectinase activity in cultured human trophoblasts is mediated by urokinase-type plasminogen activator. Am J Obstet Gynecol. 1997, 176(1 Pt 1):58-65.

17 Chiang WL, Liu JY, Liao CY, Yang SF, Hsieh YS, Chu SC. Alternation of cytosolic carbonic anhydrase isoenzymes during deciduomatal development in pregnant mice. Fertil Steril. 2004, 82 Suppl 3:1095-100.
18 Afonso S, Romagnano L, Babiarz B. The expression and function of cystatin C and cathepsin B and cathepsin L during mouse embryo implantation and placentation. Development. 1997, 124(17):3415-25.
19 Li Y, Yan J, Chang HM, Chen ZJ, Leung PCK. Roles of TGF-β Superfamily Proteins in Extravillous Trophoblast Invasion. Trends Endocrinol Metab. 2021, 32(3):170-189.
20 Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. Hum Reprod Update. 2005, 11(6):613-30.
21 Ni N, Li Q. TGFβ superfamily signaling and uterine decidualization. Reprod Biol Endocrinol. 2017, 15(1):84.
22 Kaneko-Tarui T, Zhang L, Austin KJ, Henkes LE, Johnson J, Hansen TR, Pru JK. Maternal and embryonic control of uterine sphingolipid-metabolizing enzymes during murine embryo implantation. Biol Reprod. 2007, 77(4):658-65.
23 Espinosa Cervantes R. Los esfingolípidos en la implantación embrionaria [Sphingolipids in embryonic implantation]. Ginecol Obstet Mex. 2009, 77(9):428-35.
24 Bessonnard S, Mesnard D, Constam DB. PC7 and the related proteases Furin and Pace4 regulate E-cadherin function during blastocyst formation. J Cell Biol. 2015, 210(7):1185-97.
25 Mesnard D, Donnison M, Fuerer C, Pfeffer PL, Constam DB. The microenvironment patterns the pluripotent mouse epiblast through paracrine Furin and Pace4 proteolytic activities. Genes Dev. 2011, 25(17):1871-80.
26 Demetriou C, Chanudet E; GOSgene; Joseph A, Topf M, Thomas AC, Bitner-Glindzicz M, Regan L, Stanier P, Moore GE. Exome sequencing identifies variants in FKBP4 that are associated with recurrent fetal loss in humans. Hum Mol Genet. 2019, 28(20):3466-3474.
27 Dziadek M, Darling P, Zhang RZ, Pan TC, Tillet E, Timpl R, Chu ML. Expression of collagen alpha 1(VI), alpha 2(VI), and alpha 3(VI) chains in the pregnant mouse uterus. Biol Reprod. 1995, 52(4):885-94.
28 Griffiths M, Van Sinderen M, Rainczuk K, Dimitriadis E. miR-29c overexpression and COL4A1 downregulation in infertile human endometrium reduces endometrial epithelial cell adhesive capacity in vitro implying roles in receptivity. Sci Rep. 2019, 9(1):8644.
29 Carson DD, DeSouza MM, Regisford EG. Mucin and proteoglycan functions in embryo implantation. Bioessays. 1998, 20(7):577-83.
30 Abrahamsohn PA, Zorn TM. Implantation and decidualization in rodents. J Exp Zool. 1993, 266(6):603-28.
31 Murphy SP, Tayade C, Ashkar AA, Hatta K, Zhang J, Croy BA. Interferon gamma in successful pregnancies. Biol Reprod. 2009, 80(5):848-59.
32 Ledée-Bataille N. Prédiction de l'implantation par l'analyse des cytokines. Exemple du dosage de l'interleukine 18 (IL18) dans le flushing utérin [Secreted cytokines in the uterine lumina are predictive of subsequent implantation. Presence of IL18 in the uterine flushing]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2004, 33(1 Pt 2):S29-32. French.
33 Robertson SA, O'Connell A and Ramsey A. The effect of interleukin-6 deficiency on implantation, fetal development and parturition in mice. Proc Aust Soc Reprod Biol. 2000, 31,97.
34 Namlı Kalem M, Akgun N, Kalem Z, Bakirarar B, Celik T. Chemokine (C-C motif) ligand-2

(CCL2) and oxidative stress markers in recurrent pregnancy loss and repeated implantation failure. J Assist Reprod Genet. 2017, 34(11):1501-1506.
35 Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual Control of Trophoblast Invasion. Am J Reprod Immunol. 2016, 75(3):341-50.
36 Preston AM, Lindsay LA, Murphy CR. Progesterone treatment and the progress of early pregnancy reduce desmoglein 1&2 staining along the lateral plasma membrane in rat uterine epithelial cells. Acta Histochem. 2004, 106(5):345-51.
37 Buck VU, Windoffer R, Leube RE, Classen-Linke I. Redistribution of adhering junctions in human endometrial epithelial cells during the implantation window of the menstrual cycle. Histochem Cell Biol. 2012, 137(6):777-90.
38 Oh YS, Nah WH, Choi B, Kim SH, Gye MC. Coxsackievirus and Adenovirus Receptor, a Tight Junction Protein, in Peri-Implantation Mouse Embryos. Biol Reprod. 2016, 95(1):5.
39 Clark DA, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. Procoagulants in fetus rejection: the role of the OX-2 (CD200) tolerance signal. Semin Immunol. 2001, 13(4):255-63.
40 Clark DA, Ding JW, Yu G, Levy GA, Gorczynski RM. Fgl2 prothrombinase expression in mouse trophoblast and decidua triggers abortion but may be countered by OX-2. Mol Hum Reprod. 2001, 7(2):185-94.
41 Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. Dev Biol. 2000, 217(1):42-53.
42 Lee NY, Blobe GC. The interaction of endoglin with beta-arrestin2 regulates transforming growth factor-beta-mediated ERK activation and migration in endothelial cells. J Biol Chem. 2007, 282(29):21507-17.
43 Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG. Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. Dev Biol. 2000, 217(1):42-53.
44 Morrish DW, Dakour J, Li H. Life and death in the placenta: new peptides and genes regulating human syncytiotrophoblast and extravillous cytotrophoblast lineage formation and renewal. Curr Protein Pept Sci. 2001, 2(3):245-59.
45 Chadchan SB, Kumar V, Maurya VK, Soni UK, Jha RK. Endoglin (CD105) coordinates the process of endometrial receptivity for embryo implantation. Mol Cell Endocrinol. 2016, 425:69-83.
46 Fujita D, Tanabe A, Sekijima T, Soen H, Narahara K, Yamashita Y, Terai Y, Kamegai H, Ohmichi M. Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line. J Endocrinol. 2010, 206(1):131-40.
47 Wang C, Feng Y, Zhou WJ, Cheng ZJ, Jiang MY, Zhou Y, Fei XY. Screening and identification of endometrial proteins as novel potential biomarkers for repeated implantation failure. PeerJ. 2021, 9:e11009.
48 Selcer KW, Lin GX, Beale EG, Leavitt WW. Serum corticosteroid-binding globulin (CBG) and hepatic CBG mRNA relationships during hamster pregnancy: contribution of decidualization. Biol Reprod. 1991, 44(1):185-90.

49 Lee KY, Jeong JW, Tsai SY, Lydon JP, DeMayo FJ. Mouse models of implantation. Trends Endocrinol Metab. 2007, 18(6):234-9.
50 Clements J, Mukhtar A, Ehrlich A, Yap B. Glandular kallikrein gene expression in the human uterus. Braz J Med Biol Res. 1994, 27(8):1855-63.
51 Corthorn J, Valdés G. Variations in uterine kallikrein during cycle and early pregnancy in the rat. Biol Reprod. 1994 Jun;50(6):1261-4.
52 Valdés G, Chacón C, Corthorn J, Figueroa CD, Germain AM. Tissue kallikrein in human placenta in early and late gestation. Endocrine. 2001, 14(2):197-204.
53 Fang X, Ni N, Gao Y, Lydon JP, Ivanov I, Rijnkels M, Bayless KJ, Li Q. Transforming growth factor beta signaling and decidual integrity in mice†. Biol Reprod. 2020, 103(6):1186-1198.
54 Peng J, Monsivais D, You R, Zhong H, Pangas SA, Matzuk MM. Uterine activin receptor-like kinase 5 is crucial for blastocyst implantation and placental development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015, 112(36):E5098-107.
55 Park HS, Kim JO, An HJ, Ryu CS, Ko EJ, Kim YR, Ahn EH, Lee WS, Kim JH, Kim NK. Genetic polymorphisms of the cobalamin transport system are associated with idiopathic recurrent implantation failure. J Assist Reprod Genet. 2019, 36(7):1513-1522.
56 Fujiwara H. Functional roles of cell surface peptidases in reproductive organs. Reprod Med Biol. 2004, 3(4):165-176.
57 Su X, Min S, Cao S, Yan H, Zhao Y, Li H, Chai L, Mei S, Yang J, Zhang Y, Zhang Z, Liu F, Sun W, Che Y, Yang R. LRRC19 expressed in the kidney induces TRAF2/6-mediated signals to prevent infection by uropathogenic bacteria. Nat Commun. 2014, 5:4434.
58 Ramírez-Coronel AA, Rostami A, Younus LA, Arias Gonzáles JL, Lafta MH, Amin AH, Saadoon MA, Salman HM, Bahrami A, Feilei R, Akhavan-Sigari R. Designing Effective Multi-Target Drugs and Identifying Biomarkers in Recurrent Pregnancy Loss (RPL) Using In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. Biomedicines. 2023, 11(3):879.
59 Owusu-Akyaw A, Krishnamoorthy K, Goldsmith LT, Morelli SS. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function. Hum Reprod Update. 2019, 25(1):114-133.
60 Deng T, Liao X, Zhu S. Recent Advances in Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. Obstet Gynecol Surv. 2022, 77(6):355-366.
61 La X, Wang W, Zhang M, Liang L. Definition and Multiple Factors of Recurrent Spontaneous Abortion. Adv Exp Med Biol. 2021, 1300:231-257.
62 Caetano MR, Couto E, Passini R Jr, Simoni RZ, Barini R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. Sao Paulo Med J. 2006, 124(4):181-5.
63 Abdollahi E, Tavasolian F, Ghasemi N, et al. Association between lower frequency of R381Q variant (rs11209026) in IL-23 receptor gene and increased risk of recurrent spontaneous abortion (RSA). J Immunotoxicol. 2015, 12:317–321.